

10/561951

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
6 janvier 2005 (06.01.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2005/000342 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :A61K 38/48, C07K 4/12, A61K 39/00, 38/08, 48/00,  
C12N 15/11, 5/10, G01N 33/68, A61P 35/00(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.;  
CABINET ORES, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008  
PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2004/001585

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt International : 24 juin 2004 (24.06.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

03/07659 25 juin 2003 (25.06.2003) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,  
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-  
SERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET  
DE LA RECHERCHE MEDICALE) [FR/FR]; 101,  
rue de Tolbiac, F-75013 PARIS (FR). UNIVERSITE  
DE NANTES [FR/FR]; 1, quai de Tourville, F-44000  
NANTES (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GUIL-  
LOUX, Yannick [FR/FR]; 19, rue du Loquidy, F-44300  
NANTES (FR). JOTEREAU, Francine [FR/FR]; 6, Place  
du 116ème Régiment d'Infanterie, F-44300 NANTES  
(FR). GODEFROY, Emmanuelle [FR/FR]; 59, rue  
Fontaine de Barbin, F-44000 NANTES (FR). DIEZ, Elis-  
abeth [FR/FR]; 13, rue Ramée, La Bourchinière, F-44690  
SAINT FIACRE SUR MAINE (FR). AUBRY, Agnès  
[FR/FR]; 11, impasse Minatte, F-44000 NANTES (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 2005/000342 A1

(54) Title: PEPTIDES DERIVED FROM THE PROTEIN MMP-2, AND THE USE THEREOF IN ANTITUMORAL  
IMMUNOTHERAPY(54) Titre : PEPTIDES DERIVES DE LA PROTEINE MMP-2 ET LEUR UTILISATION EN IMMUNOTHERAPIE ANTITU-  
MORALE(57) Abstract: The invention relates to peptides forming epitopes T of the antigen MMP-2, presented by MHC class I. Said peptides  
can especially be used in antitumoral immunotherapy.(57) Abrégé : L'invention est relative à des peptides constituant des épitopes T de l'antigène MMP-2, présentés par le CMH I. Ces  
peptides sont utilisables notamment en immunothérapie anti-tumorale.

**PEPTIDES DERIVES DE LA PROTEINE MMP-2 ET LEUR UTILISATION EN IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE.**

La présente invention est relative à des peptides dérivés de la protéine MMP-2 et à leur utilisation en immunothérapie antitumorale.

La vaccination ou immunothérapie peptidique est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des cancers. Son principe repose sur l'induction d'une réponse immune vis-à-vis de peptides représentant des épitopes T d'antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses exprimant ces antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTL ne reconnaissent pas les antigènes protéiques entiers, mais des fragments peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Ce sont ces fragments peptidiques qui constituent les épitopes T.

Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+, qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont reconnus par les cellules T CD4+.

L'identification de ces épitopes, et notamment de ceux présentés par le CMH I (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8+ dans la cytotoxicité), constitue donc une étape essentielle pour le développement de compositions d'immunothérapie anti-tumorale.

Le mélanome est une tumeur maligne cutanée qui se développe aux dépens des mélanocytes épidermiques que sont les cellules pigmentaires de la peau. En France, on dénombre actuellement de 9 à 10 nouveaux cas pour 100.000 habitants chaque année, soit près de 5.000 nouveaux malades.

Deux classes principales d'antigènes associés aux mélanomes (MAA) sont connues : les antigènes spécifiques, peu ou pas exprimés dans les tissus normaux, et les antigènes de différenciation mélanocytaire, qui  
5 sont également exprimés par les mélanocytes (pour revue, voir CASTELLI et al., 2000, *J Cell Physiol*, 182, 323-31 ; KIRKIN et al., 2002, *Cancer Invest*, 20, 222-36).

En raison de la forte prévalence des cancers de type mélanome, il est souhaitable d'identifier d'autres  
10 antigènes tumoraux capables d'induire une réponse immunitaire cytotoxique antitumorale.

Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont des endopeptidases Zn-dépendantes qui sont responsables de la dégradation de différents composants protéiques de la  
15 matrice extracellulaire (ECM) et des membranes basales (KHASHIGOV et al., 2001, *Biochemistry*, 66(2), 130-40). A l'heure actuelle, 21 membres de la famille MMP sont connus chez l'homme.

La sur-expression des MMPs est observée dans  
20 un grand nombre de cancers humains et est associée à un faible taux de survie. En effet, les MMPs ont la capacité de potentialiser la progression tumorale en augmentant la croissance cellulaire, la migration cellulaire et l'angiogenèse (EGEBLAD and WERB, 2002, *Nat. Rev. Cancer*,  
25 2(3), 161-74).

La protéine MMP-2 (également dénommée gélatinase A ou collagénase de type IV ; OMIM 120360) clive le collagène de type IV, la gélatine, ainsi que d'autres composants de la matrice extracellulaire. Cette  
30 protéine est exprimée dans nombre de cellules et de tissus sains ; elle est également sur-exprimée dans de nombreux cancers. De nombreuses études ont montré qu'elle est impliquée dans la progression tumorale, les métastases et l'angiogenèse (LIOTTA et al., 1980, *Nature*, 284 (5751),  
35 67-8 ; ITOH et al., 1998, *Cancer. Res.*, 58(5), 1048-51 ; BROOKS et al., 1998, *Cell*, 92(3), 391-400).

Du fait de sa sur-expression dans de nombreux types de tumeurs, et de son implication dans la transformation maligne et dans l'angiogenèse tumorale, il a été proposé d'utiliser MMP-2 comme cible de traitements antitumoraux, en inhibant son activité (EGEBLAD and WERB, 5 précité ; COUSSENS et al., 2002, Science, 295 (5564), 2387-92).

Cependant, la protéine MMP-2 n'était pas considérée jusqu'à présent comme un antigène cible capable d'induire une réponse cytotoxique antitumorale. A 10 *fortiori*, aucun épitope T de MMP-2 n'avait été identifié.

Les Inventeurs ont maintenant découvert que MMP-2 pouvait être apprêtée efficacement par des cellules de mélanome pour générer des épitopes T présentés par le 15 CMH I, et induisant des lymphocytes T cytotoxiques capables de lyser ces cellules tumorales.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'une molécule choisie parmi :

- la métalloprotéase MMP-2 ;
- 20 - un fragment de ladite métalloprotéase comprenant un épitope T présenté par le CMH I ;
- un polynucléotide codant pour ladite métalloprotéase ou pour ledit fragment ;
- 25 pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale, et plus particulièrement au traitement de mélanomes exprimant MMP-2.

Des fragments de MMP-2 utilisables conformément à la présente invention englobent notamment 30 tout peptide immunogène constitué par 8 à 11 acides aminés consécutifs de ladite métalloprotéase, et constituant un épitope T présenté par le CMH I. Ces peptides immunogènes, ainsi que les polynucléotides codant pour ces peptides, font également partie de l'objet de la présente invention.

35 Dans le cadre de l'exposé de la présente invention, on entend par « épitope T présenté par le

CMH I » un peptide capable d'induire une réponse CTL spécifique contre l'antigène dont il est issu.

A titre d'exemple non limitatif de réalisation de la présente invention, les Inventeurs ont identifié un  
5 peptide présenté par HLA-A\*0201, de séquence (code 1 lettre) GLPPDVQRV (SEQ ID NO : 1).

Ce peptide est capable d'induire une réponse CTL spécifique vis-à-vis de cellules de mélanomes HLA-A\*0201 exprimant MMP-2, et est donc notamment utilisable  
10 pour l'obtention de médicaments destinés au traitement de patients HLA-A\*0201.

D'autres épitopes T conformes à l'invention peuvent être obtenus de diverses manières à partir de l'antigène MMP-2.

15 Par exemple, il est connu que des peptides susceptibles de former un complexe avec un allèle du CMH I donné ont en commun la présence, à certaines positions, de résidus d'acides aminés particuliers, dénommés « résidus d'ancrage ». On a ainsi défini pour les différents allèles  
20 du CMH I, des motifs d'ancrage spécifiques, impliquant des acides aminés dénommés « résidus d'ancrage primaires ». Il a aussi été montré que des résidus situés en dehors des motifs d'ancrage primaires (résidus d'ancrage secondaires) pouvaient exercer un effet favorable ou défavorable sur  
25 l'affinité du peptide pour le CMH.

Le choix des séquences peptidiques susceptibles de constituer des épitopes présentés par un allèle du CMH I donné, peut s'effectuer, de manière classique, par l'analyse de la séquence peptidique de  
30 l'antigène MMP-2, afin de sélectionner les peptides possédant tout ou partie du motif d'ancrage primaire correspondant à cet allèle. Différentes bases de données répertoriant les motifs d'ancrage connus sont disponibles : à titre d'exemples, on citera la base  
35 SYFPEITHI (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>; RAMMENSEE et al., Immunogenetics, 50, 213-219, 1999), ou la base

BIMAS ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind) ; Parker et al., J. Immunol. 152, 163, 1994).

La présente invention a également pour objet des compositions comprenant au moins un peptide immunogène  
5 conforme à l'invention ou un polynucléotide codant pour ledit peptide.

Il peut s'agir en particulier de compositions multiépitopiques, capables de générer une réponse CTL polyspécifique, et qui dans ce but comprennent également  
10 un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s). Ces autres épitopes peuvent être issus de MMP-2, ou d'un ou plusieurs autres antigènes.

Des compositions multiépitopiques conformes à l'invention peuvent comprendre, pour être largement  
15 utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, des épitopes présentés par différentes molécules du CMH I. Elles peuvent également comprendre en outre au moins un épitope présenté par une molécule du CMH II, et capable d'induire une réponse T  
20 auxiliaire.

Selon un mode de réalisation préféré d'une composition conforme à l'invention, elle comprend au moins un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide immunogène conforme à l'invention.  
25 Dans le cas d'une composition multiépitopique, ledit polypeptide chimérique comprend en outre une ou plusieurs copies d'au moins un autre épitope immunogène.

On peut par exemple injecter au patient à traiter un peptide immunogène, ou une composition  
30 conformes à l'invention tels que définis ci-dessus, éventuellement associés à un adjuvant approprié. De même, des polynucléotides conformes à l'invention, de préférence intégrés dans des vecteurs d'acide nucléique, notamment des vecteurs viraux tels que des adénovirus, peuvent  
35 également être directement administrés par injection au patient à traiter.

La présente invention englobe également des cellules présentatrices de l'antigène présentant un épitope T issu de MMP-2 conforme à l'invention.

Des cellules présentatrices de l'antigène conformes à l'invention peuvent être obtenues à partir de toutes les cellules capables de présenter un antigène via le CMH I. Notamment, elles peuvent être obtenues à partir de cellules présentatrices de l'antigène professionnelles, par exemple des cellules dendritiques.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, lesdites cellules présentatrices de l'antigène sont chargées *in vitro* à l'aide d'un peptide immunogène selon l'invention, comme décrit par exemple par BAKKER et al. (Cancer Res., 55, 5330-5334, 1995) ou VAN ELSAS et al. (Eur. J. Immunol., 26, 1683-1689, 1996).

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, lesdites cellules présentatrices de l'antigène sont transfectées *in vitro* par un polynucléotide comprenant une séquence codant pour un peptide immunogène conforme à l'invention, par exemple un polynucléotide codant pour la protéine MMP-2 ou pour un fragment de celle-ci.

Les cellules présentatrices de l'antigène conformes à l'invention peuvent ensuite être injectées au patient à traiter, comme décrit par exemple par KAPLAN et al. (J. Immunol., 163(2), 699-707, 1999) ou KIM et al. (Annals of Surgical Oncology, 5(1), 64-76, 1998).

La présente invention englobe aussi l'utilisation de la protéine MMP-2, ou d'un fragment de celle-ci, et notamment d'un peptide immunogène selon l'invention, pour la détection de CTLs dirigés contre MMP-2 dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet atteint de mélanome.

Ces peptides peuvent également être utilisés pour réaliser le tri spécifique de ces CTLs. Les CTLs ainsi isolés peuvent ensuite être amplifiés *in vitro* et

réinjectés en grand nombre (de l'ordre du milliard) au patient.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de préparation de CTLs dirigés contre MMP-2, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection, à partir de CTLs prélevés sur un patient atteint de mélanome, de ceux reconnaissant la protéine MMP-2, ou un fragment de celle-ci, et notamment un peptide conforme à l'invention, et la multiplication *in vitro* des lymphocytes T ainsi sélectionnés.

La présente invention a également pour objet une préparation de CTLs dirigés contre la protéine MMP-2, et en particulier une préparation de CTLs susceptibles d'être obtenue par le procédé défini ci-dessus.

La présente invention englobe également les médicaments comprenant un principe actif choisi parmi :

- un peptide immunogène conforme à l'invention ;
- une composition multiépitopique conforme à l'invention ;
- un polynucléotide conforme à l'invention ;
- une cellule présentatrice de l'antigène conforme à l'invention ;
- une préparation de CTLs conforme à l'invention.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'induction d'une réponse cytotoxique antitumorale par un peptide conforme à l'invention issu de l'antigène MMP-2.

**EXEMPLE 1 : CARACTERISATION D'UN CLONE CTL (CLONE M134.12) RECONNAISSANT DES LIGNEES DE MELANOME HLA-A2.**

Des clones CTL ont été obtenus en stimulant par des cellules tumorales autologues (selon le protocole décrit par PANDOLFINO et al., 1992, *Eur. J. Immunol.*, 22(7), 1795-802) des lymphocytes infiltrant les tumeurs



(TIL) d'un patient (HLA A\*0201, B\*0801, Cw\*0701) atteint de mélanome. Ces clones CTL sont capables de lyser spécifiquement les cellules tumorales autologues, et de sécréter du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$  en réponse à la stimulation  
5 par ces cellules

L'un de ces clones (CTL M134.12) a été retenu pour la suite des expérimentations.

Le clone CTL M134.12 a été co-cultivé en présence de la lignée autologue M134, et de différentes  
10 lignées allogéniques (M17, M113, M147, M153, M204, FM25, FM29, IPC 277/5, M25, M44, M88, M102, M117, M171, M199, M200) issues de mélanomes de différents patients HLA A\*0201.

Après 6 heures de culture, les surnageants ont  
15 été prélevés et leur concentration en TNF $\alpha$  a été déterminée par mesure de la cytotoxicité de ces surnageants de culture pour le clone 13 de WEHI 164, comme décrit par DE PLAEN et al. (Methods, 12, 125-42, 1997).

Les résultats sont illustrés dans la Figure 1.  
20 En ordonnée, la concentration de TNF $\alpha$  en pg/ml. En abscisse, les différentes lignées testées.

Le clone CTL M134.12. reconnaît, outre la lignée M134, neuf lignées cellulaires allogéniques de mélanome exprimant HLA A\*0201. Ceci indique que ce clone  
25 CTL reconnaît un antigène commun à ces lignées et présenté par l'allèle HLA A\*0201.

#### **EXEMPLE 2 : IDENTIFICATION DE L'ANTIGENE RECONNU PAR LE CLONE CTL M134.12.**

Pour identifier l'antigène reconnu par le  
30 clone CTL M134.12, une banque d'ADNc a été construite à partir des ARNm de la lignée cellulaire tumorale M134.

#### **Construction de la banque d'ADNc**

Les ARNm Poly-(A)<sup>+</sup> ont été extraits à partir des cellules M134 en utilisant le kit Fast Track 2.0  
35 (Invitrogen Corp., Oxon, UK). La synthèse d'ADNc à partir des ARNm purifiés a été effectuée à l'aide d'un kit

(Stratagene Inc., La Jolla, CA). Les ADNc néo-synthétisés ont été ligaturés à des adaptateurs Eco RI, puis digérés par Xho I et enfin insérés au niveau des sites Eco RI et Xho I du vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.). Les plasmides recombinants obtenus ont été électroporés dans la souche *E. coli* XL1 (Stratagene Inc., La Jolla, CA). Après électroporation, près de 60.000 clones résistants à l'ampicilline ont été isolés. Pour permettre le criblage de ces clones, 574 groupes (chacun de 100 clones bactériens résistants à l'ampicilline) ont été créés. L'ADN plasmidique de chacun des groupes a été extrait par lyse alcaline à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France).

Cet ADN plasmidique a ensuite été co-transfecté, dans des cellules COS-7, avec un vecteur HLA A\*0201 (pHLA A\*0201, obtenu auprès de T. Boon, LICR, Bruxelles, Belgique).

#### Transfection des cellules COS-7

Les cellules COS-7, cultivées dans du milieu DMEM (Sigma) contenant 1 g de glucose/litre et 10% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et de la L-glutamine, ont été transfectées par le vecteur pHLA-A\*0201, seul ou en association avec l'ADN plasmidique issu de l'un des groupes de la banque d'ADNc de M134. La transfection a été effectuée selon le protocole à la DEAE-dextran-chloroquine (BRICHARD, Exp. Med. 1993, 1(78): 489-495).  $2 \cdot 10^4$  cellules COS-7 ont été transfectées avec 100 ng de plasmide pHLA-A\*0201 et, pour la co-transfection, 100 ng d'ADN plasmidique de la banque de M134. 48h après transfection, ces cellules COS-7 ont été utilisées pour stimuler le clone CTL M134.12 T. Après 6 heures de co-culture, les surnageants de culture ont été prélevés et leur concentration en TNF a été déterminée par la mesure de leur cytotoxicité pour le clone 13 de WEHI 164, comme décrit ci-dessus.

Parmi les groupes testés, un groupe positif (270) a été identifié. 96 plasmides distincts de ce groupe ont été testés individuellement pour leur capacité à induire la sécrétion de TNF $\alpha$  par le clone CTL M134.12.

5 L'un de ces plasmides, dénommé pNA134-A, induisant une sécrétion de TNF $\alpha$  comparable à celle obtenue en présence de la lignée cellulaire M134 a été sélectionné.

10 La Figure 2 compare la sécrétion de TNF $\alpha$  par le clone CTL M134.12, en l'absence de cellules stimulatrices, en présence de cellules M134, en présence de cellules COS-7 non-transfectées, en présence de cellules COS-7 transfectées par le plasmide pHLA-A\*0201 seul, et en présence de cellules COS-7 co-transfectées par  
15 les plasmides pHLA-A\*0201 et pNA134-A.

Le séquençage de pNA134-A montre qu'il contient un ADNc de 1,3kb dont la séquence correspond à l'extrémité 3' de la séquence codant pour la métalloprotéase MMP-2 (numéro d'accension : NM\_004530). La  
20 protéine MMP-2 est donc l'antigène reconnu par le clone CTL M134.12.

L'insert du plasmide pNA134-A code pour les acides aminés 501-661 de MMP-2.

25 Afin de mieux préciser la région de MMP-2 reconnue par le clone CTL M134.12 des plasmides contenant des variants tronqués de l'insert d'ADNc de NA134-A (fragment 20 codant pour les acides aminés 501-661 de MMP-2, et fragment 25 codant pour les acides aminés 501-556 de MMP-2) ont été construits.

30 Un plasmide comprenant la totalité de l'ADNc de MMP-2 a également été construit.

Chacun de ces plasmides a été co-transfecté avec pHLA A\*0201 dans des cellules COS-7, qui ont ensuite été testées pour leur capacité à induire la sécrétion de  
35 TNF $\alpha$  par le clone CTL M134.12.

Les constructions testées sont schématisées sur la Figure 3 qui indique également leur capacité à induire ou non la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  par le clone CTL M134.12.

5 Ces résultats montrent que l'épitope T reconnu par le clone CTL M134.12 se situe entre les acides aminés 556 et 593 de MMP-2.

Une série de peptides (séquences GLPPDVQRV (SEQ ID NO : 1), LGLPPDVQRV (SEQ ID NO : 2), LPPDVQRV (SEQ  
10 ID NO : 3) et GLPPDVQR (SEQ ID NO : 4)) dérivés de la région 556-593 de la protéine MMP-2 ont été synthétisés (Synt:em Nîmes, France).

Ces peptides ont été utilisés pour sensibiliser des cellules T2 marquées au  $^{51}\text{Cr}$ . Ces  
15 cellules ont été incubées 60 minutes à  $37^\circ\text{C}$  avec différentes concentrations de chacun des peptides à tester. Des cellules effectrices CTL M134.12 ont ensuite été rajoutées dans un rapport cellules effectrices/cellules cibles de 10/1. La quantité de  $^{51}\text{Cr}$   
20 relarguée dans le surnageant est mesurée 4 heures plus tard.

Les résultats sont illustrés par la Figure 4. En ordonnée, le pourcentage de lyse spécifique. En abscisse, la concentration de peptide LGLPPDVQRV (●),  
25 GLPPDVQRV (■), LPPDVQRV (▲), ou GLPPDVQR (×) en nM.

Ces résultats montrent que le peptide GLPPDVQRV est le plus efficace pour sensibiliser les cellules T2 à la lyse par le clone CTL M134.12.

**EXEMPLE 3 : EXPRESSION DE MMP-2 DANS DIFFERENTS TYPES  
30 CELLULAIRES, ET RECONNAISSANCE SPECIFIQUE DE CELLULES DE MELANOME PAR LES CTLS M134.12**

Il est connu que MMP-2 est exprimé de façon constitutive par des tissus comme l'endomètre, le foie ou l'aorte (KHASIGOV, Biochemistry, 2001), et par un nombre  
35 important de types cellulaires tels que les macrophages, les trophoblastes (YAMAMOTO, Cancer. Res., 1996), les

lymphocytes T activés par l'IL-2 (LEPPERT, JI, 1995 Esparza J., BLOOD, 1999), les fibroblastes, les kératinocytes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, les monocytes, ou les ostéoblastes (BIRKEDAL-HANSEN, Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 1993).

La capacité du clone CTL M134.12 à reconnaître des cellules (tumorales ou saines) de différents types, exprimant MMP-2 (expression vérifiée par RT-PCR et immunohistochimie) et HLA-A2 a été testée, par mesure de la sécrétion de TNF $\alpha$  par le clone CTL M134.12 en réponse à la stimulation par ces cellules. Le protocole utilisé est identique à celui décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I

	Type cellulaire	Cellules cibles	Reconnaissance par le clone CTL M134.12
Lignées tumorales	Mélanome	M17	+
		M113	+
		M134	+
		M147	+
		M153	+
		M204	+
		FM25	+
		FM29	+
		IPC 277/5	+
		GMEL	-
		M88	-
		M117	-
	Cancer colorectal	Sw480	-
	Carcinome de rein	A498	-
		R28	-
Lignées saines	Ovaire	OVCAR	-
	Thyroïde	TT	-
	Mélanocytes	98M09	-
		01MO08	-
	Kératinocytes	K1	-
	Fibroblastes	MG	-
		HFFF2	-
	Endothélium	HAEC#8186	-

Ces résultats montrent que 10 des lignées cellulaires de mélanome qui expriment MMP-2 sont reconnues par le clone CTL M134.12.

- 5 En revanche, bien qu'exprimant MMP-2 et HLA-A2, aucune des autres lignées de cellules cancéreuses, et aucune lignée de cellules non-cancéreuses n'est reconnue par le clone CTL M134.12.

- 10 En conclusion, malgré le profil d'expression ubiquitaire de la protéine MMP-2, seules les cellules de mélanome paraissent avoir la capacité de présenter efficacement un épitope de cette protéine.

## REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une molécule choisie parmi :
  - la métalloprotéase MMP-2 ;
  - un fragment de ladite métalloprotéase
- 5 comprenant un épitope T présenté par le CMH I ;
  - un polynucléotide codant pour ladite métalloprotéase ou pour ledit fragment ;
- pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale.
- 10 2) Peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de la métalloprotéase MMP-2.
- 3) Peptide immunogène selon la revendication
- 15 2, caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence GLPPDVQRV.
- 4) Polynucléotide codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3.
- 5) Composition comprenant au moins un peptide
- 20 selon une quelconque des revendications 2 ou 3, ou un polynucléotide selon la revendication 4.
- 6) Utilisation d'un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3, ou d'un polynucléotide selon la revendication 4 pour l'obtention
- 25 d'un médicament.
- 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de mélanomes.
- 8) Cellule présentatrice de l'antigène isolée
- 30 exprimant une molécule du CMH I, caractérisée en ce qu'elle est chargée *in vitro* par un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3.
- 9) Cellule présentatrice de l'antigène exprimant une molécule du CMH I, caractérisée en ce
- 35 qu'elle est transfectée par un polynucléotide comprenant une séquence codant pour un peptide immunogène selon une quelconque des revendications 2 ou 3.

10) Utilisation de la métalloprotéase MMP-2 ou d'un fragment de celle-ci pour la détection de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre MMP-2 dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet atteint de mélanome.

5 11) Procédé de préparation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la métalloprotéase MMP-2, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection, à partir de lymphocytes T cytotoxiques prélevés sur un patient atteint de mélanome, de ceux reconnaissant MMP-2 ou un fragment de  
10 celle-ci, et la multiplication *in vitro* des lymphocytes T ainsi sélectionnés.

12) Préparation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la métalloprotéase MMP-2, laquelle préparation est susceptible d'être obtenue par le procédé  
15 selon la revendication 11.

13) Médicament, comprenant un principe actif choisi parmi :

- un peptide immunogène selon une quelconque des revendications 2 ou 3 ;
- 20 - un polynucléotide selon la revendication 4 ;
- une cellule présentatrice de l'antigène selon une quelconque des revendications 8 ou 9 ;
- une préparation de lymphocytes T cytotoxiques selon la revendication 12.

25



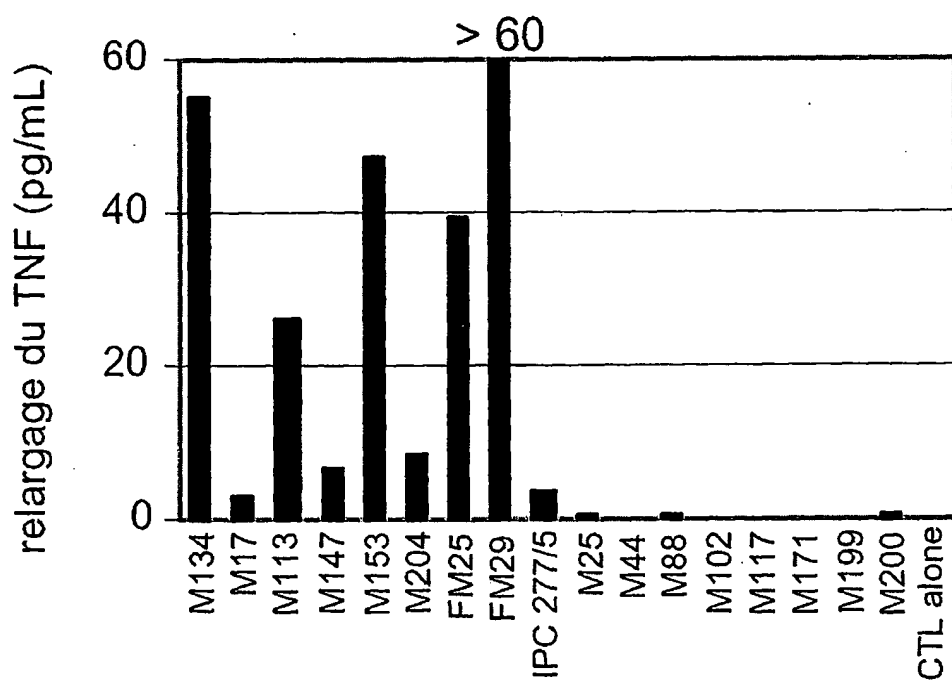


FIG 1

BEST AVAILABLE COPY

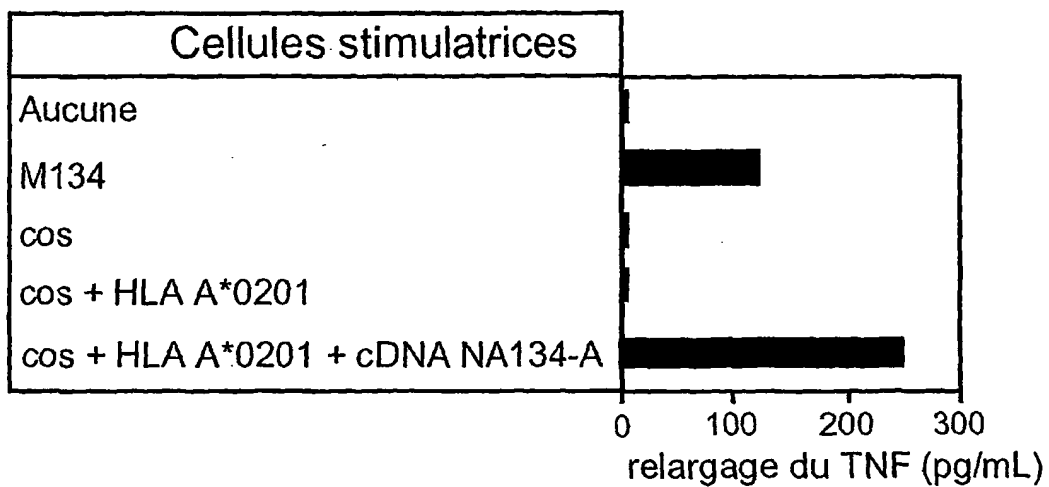


FIG 2

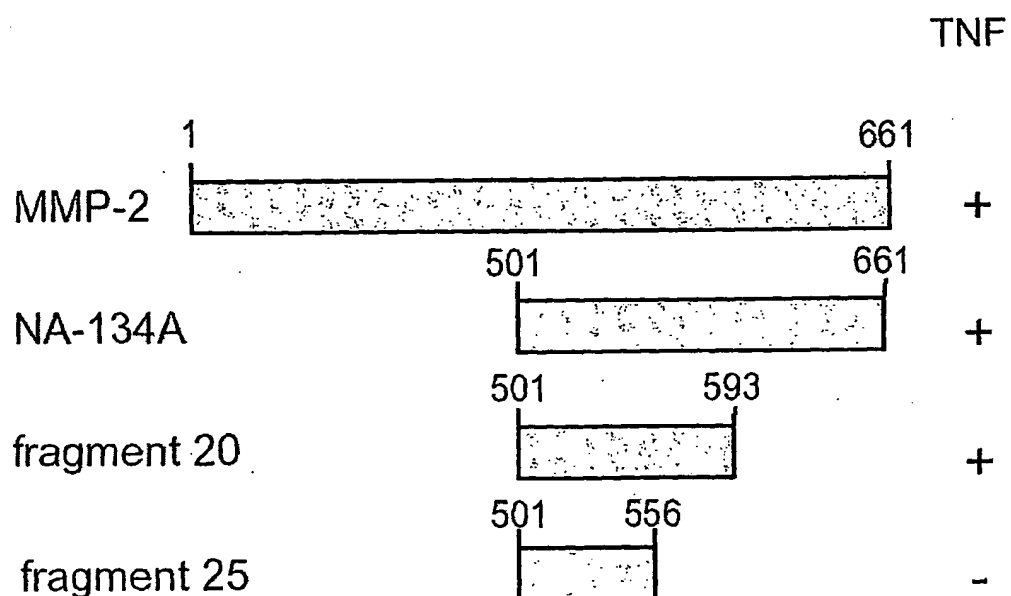


FIG 3

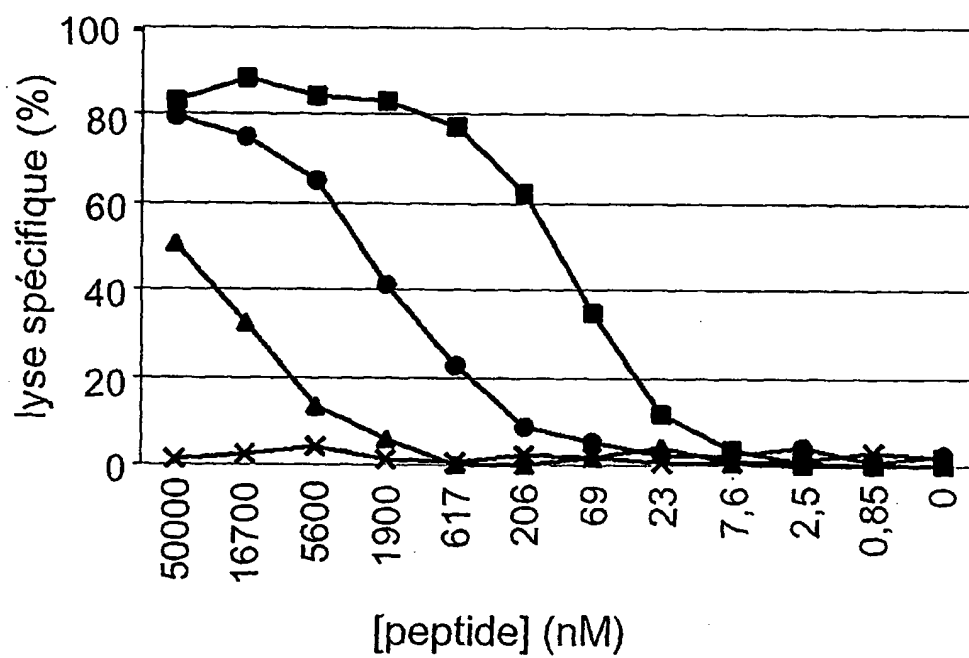


FIG 4

F0598-FR-P-77-SEQ  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; INSERM

<120> Peptides dérivés de la protéine MMP-2  
et leur utilisation en immunothérapie  
antitumorale

&lt;130&gt; MJPah-598/77

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val  
1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val  
1 5 10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

F0598-FR-P-77-SEQ

&lt;400&gt; 3

Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val  
1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg  
1 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/001585

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K38/48 C07K4/12 A61K39/00 A61K38/08 A61K48/00 C12N15/11 C12N5/10 G01N33/68 A61P35/00																				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A61P G01N C12N C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CANCERLIT, Sequence Search																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 02/098351 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 12 December 2002 (2002-12-12)</td> <td>1,2,4-7, 13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>* voir Seq. 1, page 8 lignes 2-24, revendications 16, 19 et 30 *</td> <td>1-7,13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>BROOKS P C ET AL: "Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 92, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 391-400, XP002195424 ISSN: 0092-8674</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>* voir page 396 col. droite paragraphe 2, page 391 col. droite, page 399 col. gauche paragraphe 3 *</td> <td>1-7,13</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">----- -/-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 02/098351 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 12 December 2002 (2002-12-12)	1,2,4-7, 13	Y	* voir Seq. 1, page 8 lignes 2-24, revendications 16, 19 et 30 *	1-7,13	X	BROOKS P C ET AL: "Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 92, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 391-400, XP002195424 ISSN: 0092-8674	1	Y	* voir page 396 col. droite paragraphe 2, page 391 col. droite, page 399 col. gauche paragraphe 3 *	1-7,13		----- -/-	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	WO 02/098351 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 12 December 2002 (2002-12-12)	1,2,4-7, 13																		
Y	* voir Seq. 1, page 8 lignes 2-24, revendications 16, 19 et 30 *	1-7,13																		
X	BROOKS P C ET AL: "Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 92, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 391-400, XP002195424 ISSN: 0092-8674	1																		
Y	* voir page 396 col. droite paragraphe 2, page 391 col. droite, page 399 col. gauche paragraphe 3 *	1-7,13																		
	----- -/-																			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.																				
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *8* document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report																		
22 November 2004		30/11/2004																		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Merckling-Ruiz, V																		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/001585

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/80811 A (GEN HOSPITAL CORP ;WEISSBACH LAWRENCE (US)) 1 November 2001 (2001-11-01)	1,2,4-7, 13
Y	* voir pages 2-4, page 11 et revendications 1-2 *	1-7,13
X	WO 97/45137 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;BROOKS PETER (US); CHERESH DAVID A (US)) 4 December 1997 (1997-12-04)	1
Y	* voir revendications 1,2 et 26, Seq. 17 à 28 *	1-7,13
T	MASSOVA I ET AL: "MATRIX METALLOPROTEINASES: STRUCTURES, EVOLUTION, AND DIVERSIFICATION" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, vol. 12, 1998, pages 1075-1095, XP002949725 ISSN: 0892-6638 * voir page 1088 paragraphe 2 *	1-13
A	EGEBLAD M. ET WERB Z.: "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." NATURE REVIEWS CANCER, vol. 2, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 161-174, XP009023724 * voir le document entier *	1-13



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/001585

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02098351	A	12-12-2002	US 2002182215 A1 CA 2448828 A1 WO 02098351 A2	05-12-2002 12-12-2002 12-12-2002
WO 0180811	A	01-11-2001	AU 5586101 A WO 0180811 A2 US 2002151481 A1	07-11-2001 01-11-2001 17-10-2002
WO 9745137	A	04-12-1997	AU 3218397 A AU 3289397 A BR 9709514 A CA 2256543 A1 CA 2256588 A1 CN 1226254 A CZ 9803800 A3 CZ 9803834 A3 EP 0907661 A1 EP 0951295 A1 HU 9901628 A2 HU 9902099 A2 JP 2002515036 T KR 2000016301 A KR 2000016302 A NO 985574 A NO 985575 A PL 330240 A1 PL 330241 A1 WO 9745447 A1 WO 9745137 A1 AU 738782 B2 AU 733303 B2 CN 1226172 A JP 2000516201 T RU 2194528 C2 RU 2195312 C2 SK 163298 A3 SK 163598 A3 US 6500924 B1 US 2004063790 A1	05-01-1998 05-01-1998 10-08-1999 04-12-1997 04-12-1997 18-08-1999 12-05-1999 12-05-1999 14-04-1999 27-10-1999 30-08-1999 28-09-1999 21-05-2002 25-03-2000 25-03-2000 01-02-1999 01-02-1999 10-05-1999 10-05-1999 04-12-1997 04-12-1997 27-09-2001 10-05-2001 18-08-1999 05-12-2000 20-12-2002 27-12-2002 12-07-1999 11-06-1999 31-12-2002 01-04-2004

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR2004/001585

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7    A61K38/48    C07K4/12    A61K39/00    A61K38/08    A61K48/00 C12N15/11    C12N5/10    G01N33/68    A61P35/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7    A61K    A61P    G01N    C12N    C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CANCERLIT, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/098351 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 12 décembre 2002 (2002-12-12)	1, 2, 4-7, 13
Y	* voir Seq. 1, page 8 lignes 2-24, revendications 16, 19 et 30 *	1-7, 13
-----		
X	BROOKS P C ET AL: "Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 92, 6 février 1998 (1998-02-06), pages 391-400, XP002195424 ISSN: 0092-8674	1
Y	* voir page 396 col. droite paragraphe 2, page 391 col. droite, page 399 col. gauche paragraphe 3 *	1-7, 13
-----		
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22 novembre 2004</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">30/11/2004</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Merckling-Ruiz, V</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/001585

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/80811 A (GEN HOSPITAL CORP ;WEISSBACH LAWRENCE (US)) 1 novembre 2001 (2001-11-01)	1,2,4-7, 13
Y	* voir pages 2-4, page 11 et revendications 1-2 *	1-7,13
X	WO 97/45137 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;BROOKS PETER (US); CHERESH DAVID A (US)) 4 décembre 1997 (1997-12-04)	1
Y	* voir revendications 1,2 et 26, Seq. 17 à 28 *	1-7,13
T	MASSOVA I ET AL: "MATRIX METALLOPROTEINASES: STRUCTURES, EVOLUTION, AND DIVERSIFICATION" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, vol. 12, 1998, pages 1075-1095, XP002949725 ISSN: 0892-6638 * voir page 1088 paragraphe 2 *	1-13
A	EGEBLAD M. ET WERB Z.: "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." NATURE REVIEWS CANCER, vol. 2, no. 3, mars 2002 (2002-03), pages 161-174, XP009023724 * voir le document entier *	1-13

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/001585

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02098351	A	12-12-2002	US 2002182215 A1	05-12-2002
			CA 2448828 A1	12-12-2002
			WO 02098351 A2	12-12-2002
WO 0180811	A	01-11-2001	AU 5586101 A	07-11-2001
			WO 0180811 A2	01-11-2001
			US 2002151481 A1	17-10-2002
WO 9745137	A	04-12-1997	AU 3218397 A	05-01-1998
			AU 3289397 A	05-01-1998
			BR 9709514 A	10-08-1999
			CA 2256543 A1	04-12-1997
			CA 2256588 A1	04-12-1997
			CN 1226254 A	18-08-1999
			CZ 9803800 A3	12-05-1999
			CZ 9803834 A3	12-05-1999
			EP 0907661 A1	14-04-1999
			EP 0951295 A1	27-10-1999
			HU 9901628 A2	30-08-1999
			HU 9902099 A2	28-09-1999
			JP 2002515036 T	21-05-2002
			KR 2000016301 A	25-03-2000
			KR 2000016302 A	25-03-2000
			NO 985574 A	01-02-1999
			NO 985575 A	01-02-1999
			PL 330240 A1	10-05-1999
			PL 330241 A1	10-05-1999
			WO 9745447 A1	04-12-1997
			WO 9745137 A1	04-12-1997
			AU 738782 B2	27-09-2001
			AU 733303 B2	10-05-2001
			CN 1226172 A	18-08-1999
			JP 2000516201 T	05-12-2000
			RU 2194528 C2	20-12-2002
			RU 2195312 C2	27-12-2002
			SK 163298 A3	12-07-1999
			SK 163598 A3	11-06-1999
			US 6500924 B1	31-12-2002
			US 2004063790 A1	01-04-2004